

(19)



Europäisches Patentamt

European Patent Office

Office européen des brevets



(11)

EP 0 847 755 A1

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(43) Veröffentlichungstag:
17.06.1998 Patentblatt 1998/25

(51) Int. Cl.⁶: A61K 35/78

(21) Anmeldenummer: 97121030.7

(22) Anmeldetag: 29.11.1997

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU MC
NL PT SE
Benannte Erstreckungsstaaten:
AL LT LV MK RO SI

(30) Priorität: 14.12.1996 DE 19652183

(71) Anmelder:
SCHAPER & BRÜMMER GMBH & CO. KG
D-38259 Salzgitter (DE)

(72) Erfinder:
• Nesselhut, Thomas Dr.
37075 Göttingen (DE)

• Bodinet, Cornelia
38259 Salzgitter (DE)
• Schnelder, Peter Dr.
38259 Salzgitter (DE)
• Freudenstein, Johannes Dr.
38640 Goslar (DE)

(74) Vertreter:
Lins, Edgar, Dipl.-Phys. Dr.jur. et al
GRAMM, LINS & PARTNER
Theodor-Heuss-Strasse 1
38122 Braunschweig (DE)

(54) Verwendung eines Extraktes aus *Cimicifuga racemosa*

(57) Die Wirkung eines standardmäßig zur Behandlung östrogenabhängiger Tumore eingesetzten anti-östrogenen Wirkstoffs wird potenziert durch die gleichzeitige Gabe eines Extraktes aus *Cimicifuga racemosa*, vorzugsweise in Dosierungen zwischen 5 mg und 500 mg Droge pro Tag.

BEST AVAILABLE COPY

EP 0 847 755 A1

Beschreibung

Die Erfindung betrifft die Verwendung eines Extraktes aus *Cimicifuga racemosa* zur Behandlung östrogen-abhängiger Tumore.

Extrakte aus dem Wurzelstock der Traubensilberkerze (*Cimicifugae racemosae rhizoma*) weisen östrogenähnliche Effekte auf. In den Extrakten sind Komponenten gefunden worden, die spezifisch an Östrogenrezeptoren binden und bei ovariectomierten Ratten die Gonadotropinspiegel senken können. Die Verabreichung dieser Extrakte zur Behandlung klimakterischer Beschwerden und Dysmenorrhö hat sich daher bewährt.

Für Mammakarzinom-Risikopatienten verbietet sich die Anwendung von östrogenhaltigen Arzneimitteln zur Regulierung von klimakterischen Beschwerden, da die Ausbreitung von östrogenabhängigen Tumoren naturgemäß durch Östrogengaben verstärkt wird. Da der Mechanismus der Wirkungsweise für die östrogen-analogen Substanzen noch unklar ist, ist vorsorglich für die Verabreichung dieser Substanzen ein Risiko für östrogenabhängige Tumore als Kontraindikation angesehen worden.

Es ist zwar bereits berichtet worden (Nesselhut et al. in TW Gynäkologie (1993) Seiten 249 bis 250), daß die Phytopharmaka Rhaponticin und *Cimicifuga*-Extrakt in niedrigeren Konzentrationen die Proliferation von Karzinomzellen *in vitro* verstärken, in höheren Konzentrationen hingegen möglicherweise hemmen.

Eine Verifizierung dieser Ergebnisse ist nicht publiziert worden, so daß das Verbot der Verabreichung von Phytopharmaka mit östrogen-analoger Wirkung für Risikopatienten bezüglich östrogenabhängiger Tumore weiterhin besteht.

Es ist bekannt, östrogenabhängige Tumore mit einem antiöstrogenen Wirkstoff zu therapieren. Der gängigste Wirkstoff dieser Art ist derzeit Tamoxifen (Z)-2-[4-(1,2-Diphenyl-1-Butenyl) Phenoxy]-N,N-Dimethylethylamin).

Für die Patienten, die mit einem derartigen Anti-östrogen behandelt wurden, kam aus den oben erwähnten Gründen eine Regulierung der klimakterischen Beschwerden durch Östrogene oder östrogen-analoge Substanzen nicht in Betracht.

Eine Hemmung der Proliferation von Mammatumorzellen ist abhängig von der Konzentration des Tamoxifens. Der Erhöhung der Konzentration in einen Bereich hinein, wo die Proliferation der Tumorzellen sicher verhindert wird, ist jedoch nicht möglich, da Tamoxifen in diesen Konzentrationen toxisch wird.

Die vorliegende Erfindung geht daher von der Problemstellung aus, eine Tumorthherapie auch mit niedrigeren Antiöstrogen-Konzentrationen zu ermöglichen.

Erfindungsgemäß wird hierzu in Kombination mit dem Antiöstrogenen Wirkstoff ein Extrakt aus *Cimicifuga racemosa* verwendet.

Überraschenderweise hat sich herausgestellt, daß

der Extrakt aus *Cimicifuga racemosa* die Proliferation von östrogenabhängigen Tumorzellen nicht nur nicht verstärkt sondern in Kombination mit einem antiöstrogenen Wirkstoff dessen proliferationshemmende Wirkung deutlich verstärkt, so daß auch eine vollständige Proliferationshemmung erreichbar ist, ohne in den Bereich der Toxizitätsgrenze für den antiöstrogenen Wirkstoff geraten zu müssen.

Die Potenzierung der Wirkung eines antiöstrogenen Wirkstoffes ist anhand des Standard-Wirkstoffes Tamoxifen genauer untersucht worden. Andere Experimente geben Hinweise darauf, daß auch die antiöstrogene Wirkung von Genistein durch einen Extrakt aus *Cimicifuga racemosa* verstärkt wird. Bevorzugte Verdünnungen des Extraktes liegen im Bereich zwischen 10^{-3} und 10^{-5} , da Verdünnungen bis 10^{-2} *in vitro* toxische Effekte hervorbringen. Bevorzugte Dosierungen liegen zwischen etwa 5 mg und 500 mg Droge pro Tag.

Die erfindungsgemäße Wirkung des *Cimicifuga*-Extraktes auf die Proliferation von östrogenabhängigen Karzinomzellen, insbesondere Mammakarzinomzellen, ist *in vitro* mit einem Testsystem aus MCF-7 Zellen erfolgt.

Die MCF-7 Zelllinie ist ein etabliertes *in vitro* Modell für östrogenabhängige Tumore, die sowohl Östrogenrezeptoren als auch Aromataseaktivität besitzen. Die menschliche Brustkrebslinie wurde abgeleitet von einer Pleuraeffusion bei einem metastasierenden Brusttumor und besitzt signifikante Mengen an 17β Rezeptoren (Schwarte, A. (1994) Wirkspektrum ausgewählter Flavonoide auf die humane Brustkrebslinie MCF-7: Eine *in vitro* Studie. Witten-Herdecke, Universität, Bereich Medizin, Diss. 1994).

Der Einfluß von *Cimicifuga*-Extrakt auf die Proliferation der MCF-7 Zellen wurde anhand des Einbaus von radioaktiv markiertem Thymidin bestimmt.

Material und Methoden

Testsubstanzen

17β -Estradiol (Sigma) und Tamoxifencitrat (Sigma) wurden 1-M in DMSO (Dimethylsulfoxid) gelöst und in einer 1:10 Verdünnungsreihe in Zellkulturmedium entsprechend weiter verdünnt. *Cimicifuga*-Extrakt wurde in einer 1:10 Verdünnungsreihe direkt mit Zellkulturmedium verdünnt.

Herstellung des *Cimicifuga racemosa*-Extraktes

Nach Prüfung auf Identität, Reinheit und Gehalt wurden 30 kg der zerkleinerten Arzneidroge *Cimicifuga racemosa rhizoma* für 10 Tage mit 50 l Isopropylalkohol 40 % (V/V) mazeriert. Der Extrakt wurde abgelassen und die Droge abgepreßt. Die vereinigten Fraktionen wurden mit Isopropylalkohol 40 % (V/V) auf ein Endvolumen von 35 l aufgefüllt.

ssay MCF-7

ellen wurden von der ATCC (HTB 22) n Eagle's MEM (Eagle's Minimal-Essen- tit nicht-essentiellen Aminosäuren, 1mM t, 10 µg/ml Insulin und 10 % FKS (Foeta- m) kultiviert.

z in den Test wurden die MCF-7 Zellen ne Passage in Eagle's MEM ohne Phe- l-essentiellen Aminosäuren, 1 mM Natri- µg/ml Insulin und 5 % FKS (Foetales gehalten. Um östrogenfreie Wachstums- n Test zu erhalten, wurde für den Testan- 1 aus dem Zellkulturmedium entfernt und 1 5 % "Characoal stripped" FKS (CSF)

er auf 5×10^4 c/ml eingestellten Zellsus- n pro Vertiefung in 96er Mikrotiterplatten rt und 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ im ubiert. Danach wurden die Überstände nommen und 150 µl frisches Zellkultur- rtiefung pipettiert.

stanzen wurden gelöst, in Zellkulturme- und in 4 Parallelen a 50 µl/Vertiefung Kontrollen wurden Zellkulturmedium urchenden Lösungsmittelverdünnungen iert.

agen Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ ellen mit 25 µl/Napf (6-³H)-Thymidin ez. Aktivität 2 Ci/mMol) für 8 h gepulst. 1 sie nach Standardmethoden (Cell Har- auf Glasfaserfilter geerntet und in einem tions-Counter (Wallac) gezählt. Die den als cpm = "counts per minute" aus-

"Charcoal-Stripped" FKS (CSF)

"Dextran coated charcoal tablets"(Ster-) wurde in 10 ml FKS aufgelöst. Danach µm 2x45 min im Wasserbad bei 56 °C n Anschluß bei 3000 rpm 10 min zentri- erstand wurde abgenommen und über Porengröße 0,2 µm filtriert.

nung der Toxizität der einzelnen Prüf- de ein Fluoreszenzassay mit Hela Sus- durchgeföhrt.

wurden auf eine Zelldichte von $2,5 \times 10^5$ agle's MEM + 5 % FKS) eingestellt und ension in 96er Mikrotiterplatten (Nunc) 24 h Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ Verdünnungsreihe der Testsubstanzen legt und von jeder Verdünnung jeweils tiefung in 4 Parallelen pipettiert. Die 48 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

Danach wurden die Mikrotiterplatten bei 800 rpm zentri- fugiert und die Überstände vorsichtig abgenommen. 200 µl einer Lösung aus 0,1 mg/ml 4-Methylumbellife- ryheptanoat in PBS wurden pro Vertiefung pipettiert. Nach 60 min wurden die Fluoreszenzeinheiten pro Ver- tiefung in einem Mikrotiterplattenfluorimeter (Fluoros- kan II) bestimmt.

Ergebnisse

Zu Beginn der Untersuchungen wurde zunächst das Testsystem auf seine Sensitivität überprüft. Als Positivkontrolle wurde 17-β Östradiol in Dosierungen von 10^{-7} , 10^{-8} bzw. 10^{-9} -Molar getestet.

In allen drei getesteten Dosierungen induzierte 17-β Östradiol eine Steigerung der Proliferation von MCF-7 Zellen um 80-100 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, wie aus Figur 1 ersichtlich ist.

Parallel wurde in jedem Testansatz eine Lösungs- mittelkontrolle durchgeführt. DMSO bewirkte in der maximal im Test eingesetzten Konzentration keine signifikante Proliferationssteigerung oder -hemmung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

In einem weiteren Ansatz wurde der Einfluß des nicht-steroidalen Antiöstrogens Tamoxifen auf das Test- system geprüft.

Tamoxifen bewirkte in den Dosierungen 10^{-4} und 10^{-5} -Molar eine 100%ige bzw. 77%ige Hemmung der Proliferation, in Dosierungen von 10^{-6} dagegen eine Steigerung der Einbauraten um 52 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

Die antiproliferative Wirkung von Tamoxifen zeigte sich auch, wenn Tamoxifen zusammen mit einer kon- stanten Dosis an Östradiol appliziert wurde. Die östro- geninduzierte Proliferationssteigerung konnte dosis- abhängig durch Tamoxifen inhibiert werden.

Die Ergebnisse dieser Vorversuche machten deut- lich, daß das MCF-7 Testsystem geeignet ist, sowohl östrogene als auch antiöstrogene Wirkungen von Test- substanzen nachzuweisen.

Um dies zu kontrollieren, wurden in den folgenden Versuchsserien neben Mediumkontrollen und Lösungs- mittelkontrollen (Negativkontrollen) jeweils eine Positiv- kontrolle für östrogene Wirkung, bestehend aus 17β- Östradiol in einer Dosierung von 10^{-7} oder 10^{-8} -Molar und eine Positivkontrolle für antiöstrogene Wirkung, bestehend aus Tamoxifen in einer Dosierung von 10^{-5} - Molar, mitgeföhrt.

Bevor der Cimicifuga-Extrakt in das MCF-7 System eingesetzt wurde, wurde dessen Toxizität zunächst in einem Toxizitätsassay mit Hela-Zellen überprüft.

Bis zu einer Verdünnung von 10^{-2} zeigte der Extrakt auf dieser Zelllinie toxische Effekte. Ab einer Verdün- nung von 10^{-3} waren keine Unterschiede zwischen Mediumkontrolle und Testansatz feststellbar (Fig. 2). Um unspezifische cytotoxische Effekte ausschließen zu können, wurde diese Verdünnung daher als Maximaldo- sis für die Testserien auf MCF-7 Zellen eingesetzt.

Einfluß von Östradiol und Tamoxifen auf die Proliferation von MCF-7 Zellen

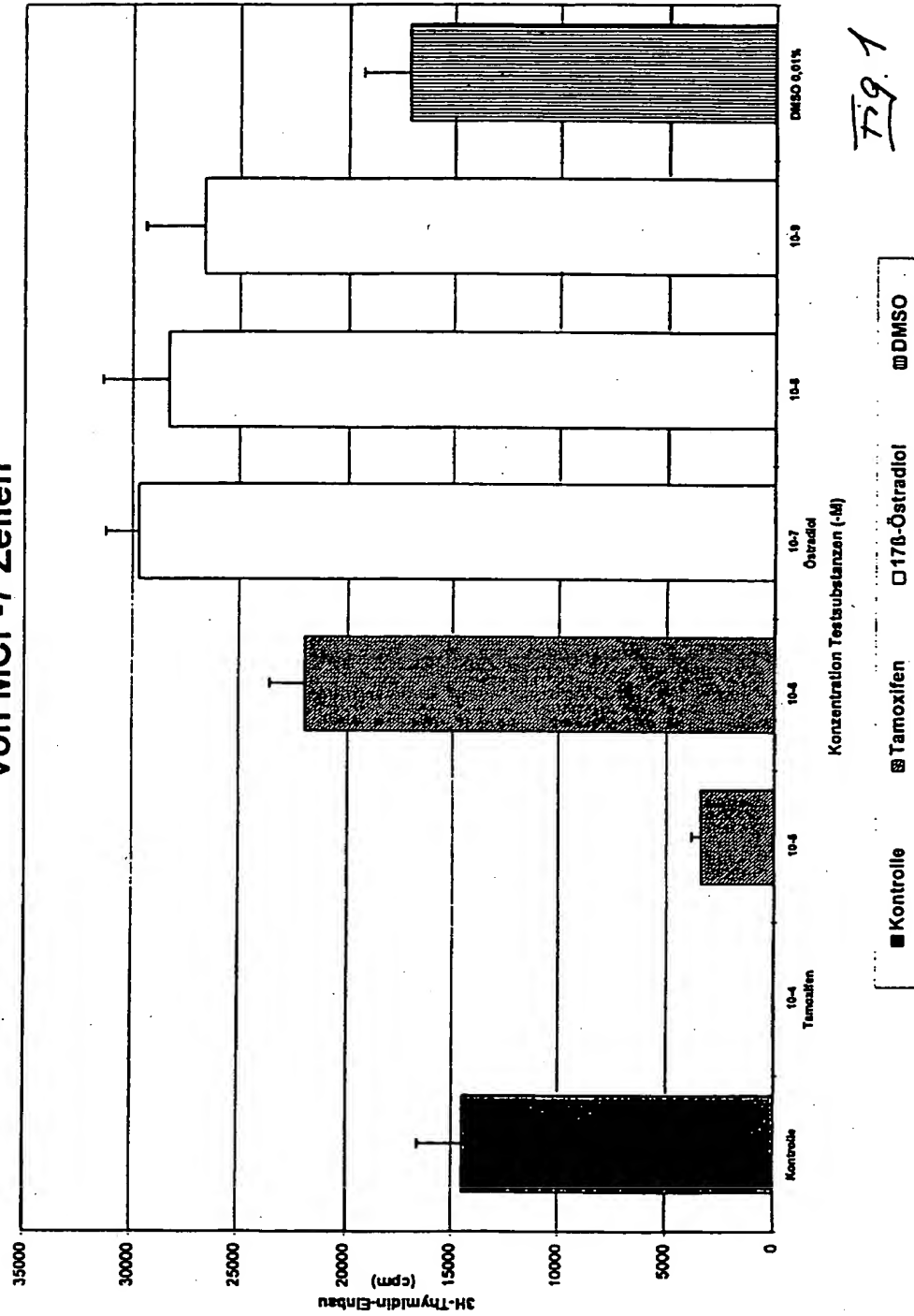
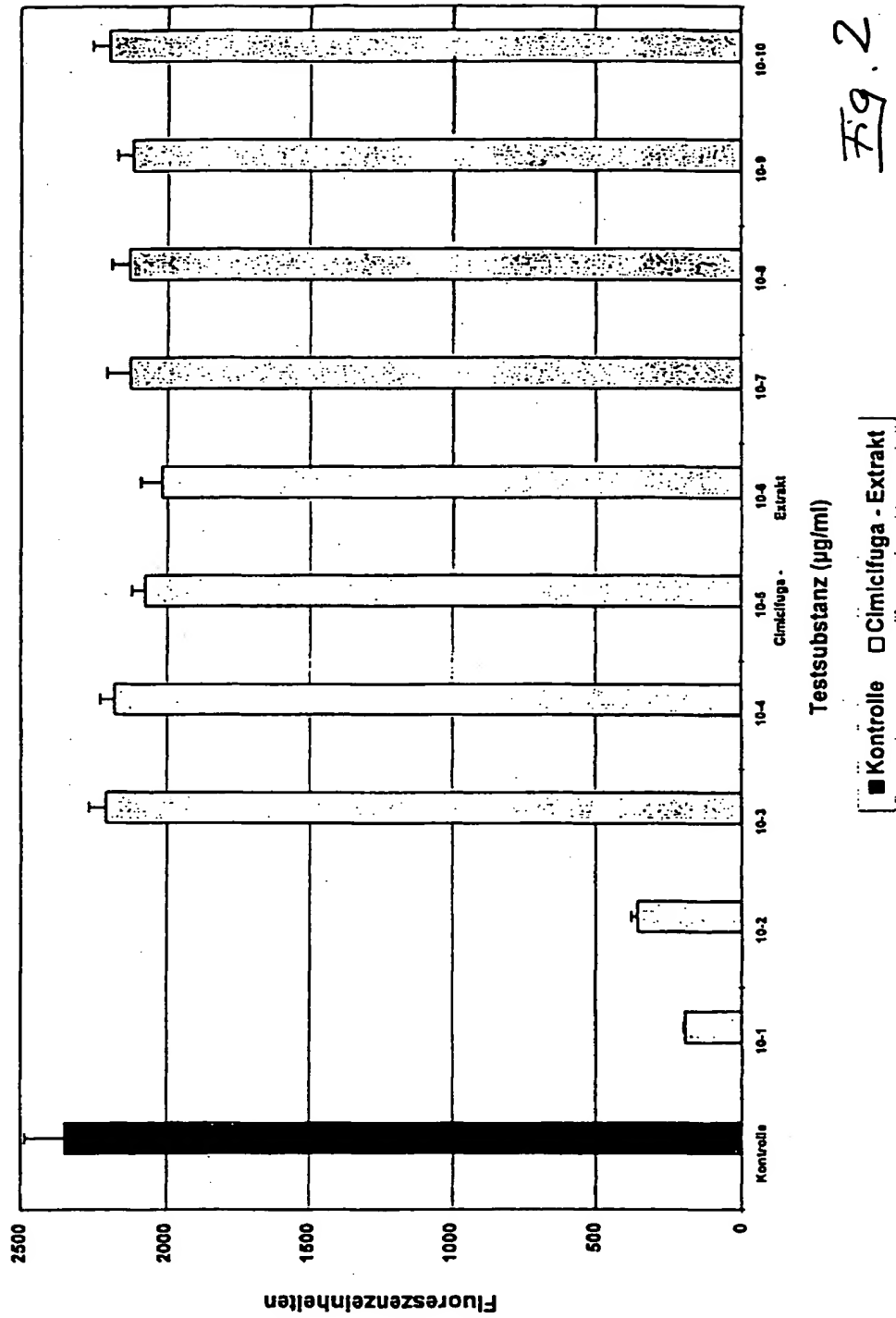


Fig. 1

Toxizitätsbestimmung



Einfluß von Cimicifuga Extrakt auf die tamoxifeninduzierte Proliferationshemmung von MCF-7 Zellen

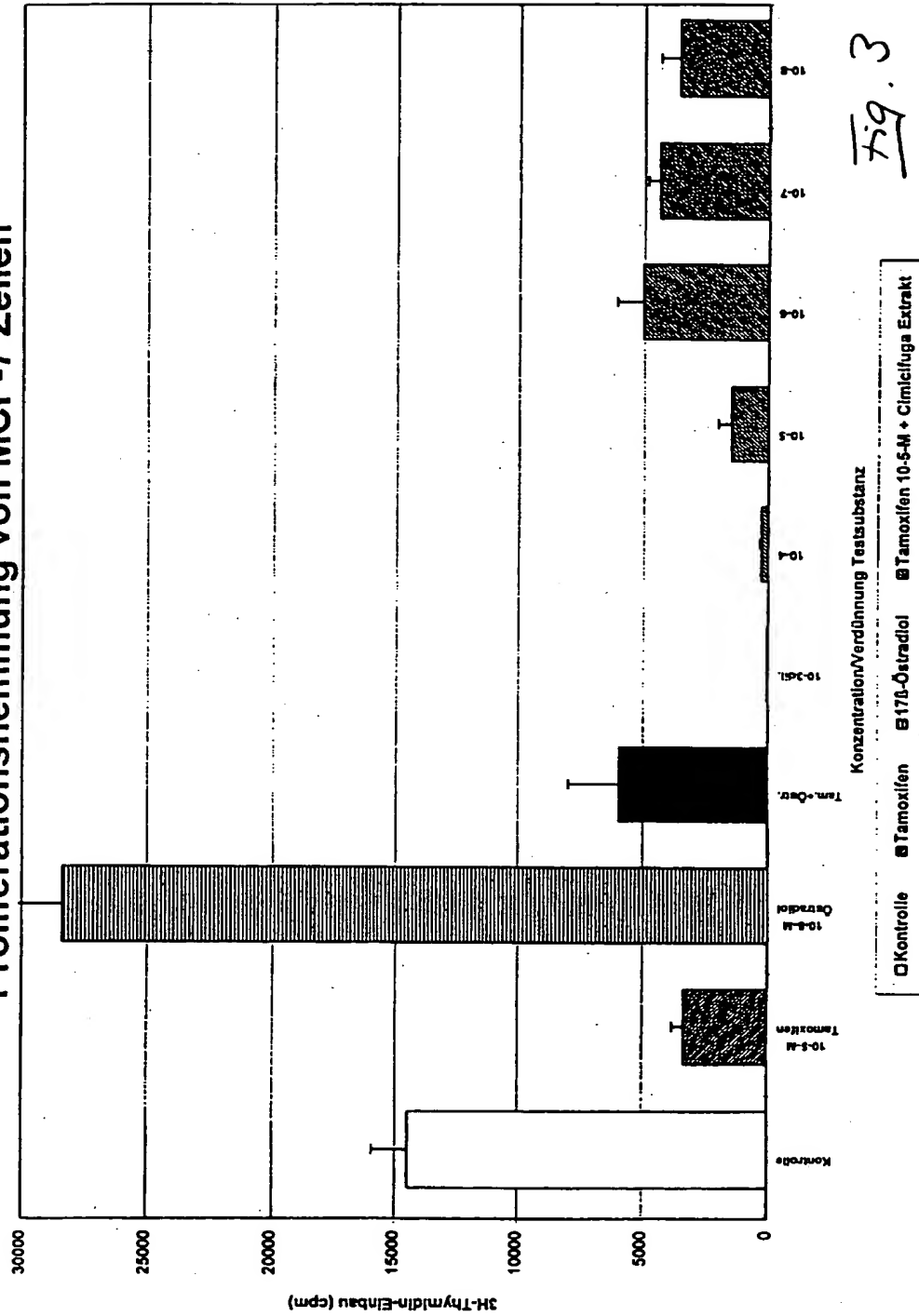


Fig. 3



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung
EP 97 12 1030

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kernzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.6)
X	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 015, no. 001 (C-0793), 7. Januar 1991 & JP 02 255622 A (TSUMURA & CO), 16. Oktober 1990, * Zusammenfassung *	1	A61K35/78
X	T. NESSELHUT ET AL.: "UNTERSUCHUNGEN ZUR PROLIFERATIVEN POTENZ VON PHYTOPHARMAKA MIT ÖSTROGENÄHNLICHER WIRKUNG BEI MAMMAKARZINOMZELLEN." ARCHIVES OF GYNECOLOGY AND OBSTETRICS, Bd. 254, Nr. 1-4, 1993, Seiten 817-818, XP002060552 * das ganze Dokument *	1	
			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int.Cl.6)
			A61K
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchenort DEN HAAG		Abschlußdatum der Recherche 6. April 1998	Prüfer Rempp, G
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE		T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : Älteres Patentedokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : In der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument ----- & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument	
X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur			

EPO FORM 1503 03/92 (P/C/C03)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ BLACK BORDERS

☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☒ FADED TEXT OR DRAWING

☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☐ SKEWED/SLANTED IMAGES

☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.